

⑯ BUNDESREPUBLIK

DEUTSCHLAND



DEUTSCHES

PATENTAMT

# ⑯ Offenlegungsschrift

## ⑯ DE 3642939 A1

⑯ Int. Cl. 4:

**C07H 21/04**

C 12 Q. 1/68

G 01 N 33/68

G 01 N 33/52

⑯ Aktenzeichen: P 36 42 939.2

⑯ Anmeldetag: 16. 12. 86

⑯ Offenlegungstag: 10. 12. 87

Behördeneigentum

⑯ Innere Priorität: ⑯ ⑯ ⑯

03.06.86 DE 36 18 593.0

⑯ Anmelder:

Europäisches Laboratorium für Molekularbiologie  
(EMBL), 6900 Heidelberg, DE

⑯ Vertreter:

Weickmann, H., Dipl.-Ing.; Fincke, K., Dipl.-Phys.  
Dr.; Weickmann, F., Dipl.-Ing.; Huber, B.,  
Dipl.-Chem.; Liska, H., Dipl.-Ing. Dr.-Ing.; Prechtel,  
J., Dipl.-Phys. Dr.rer.nat., Pat.-Anw., 8000 München

⑯ Erfinder:

Sproat, Brian, Dr., 6900 Heidelberg, DE

⑯ Verfahren zur DNA-Markierung

Es wird ein Verfahren zur Markierung von DNA-Fragmenten (Oligonukleotiden) unter Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen beschrieben. Erfindungsgemäß erfolgt die Markierung dadurch, daß man die DNA-Fragmente in ihre 5'-(S-Triphenyl-methyl-3-mercaptopropylphosphol)-Derivate überführt und diese nach Abspaltung der Triphenylmethylgruppe mit einem (5- und/oder 6)-Jodacetamino-Rhodamin oder Fluorescein umsetzt.

Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich sehr gut für die Markierung von DNA-Fragmenten bei der DNA-Sequenzanalyse nach der Didesoxy-Methode, z. B. zur Fluoreszenzmarkierung von M13-Primer.

DE 3642939 A1

DE 3642939 A1

## Patentansprüche

1. Verfahren zur Markierung von DNA-Fragmenten unter Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen, dadurch gekennzeichnet, daß man die DNA-Fragmente in ihr 5'-(S-Tiphenyl-methyl-3-mercaptopro-<sup>5</sup>pylphospho)-Derivat überführt und dieses nach Abspaltung der Triphenylmethylgruppe mit einem (5- und/oder 6)-Jodacetamino-Rhodamin oder -Fluorescein umsetzt.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man als (5- und/oder 6)-Jodacetamino-Rhoda-<sup>10</sup>min das (5- und/oder 6)-Jodacetamino-tetramethyl-Rhodamin einsetzt.

3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man als (5- und/oder 6)-Jodacetamino-Fluorescein das 5-Jodacetamino-Fluorescein einsetzt.

4. Verwendung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 3 zur Sequenzanalyse von DNA.

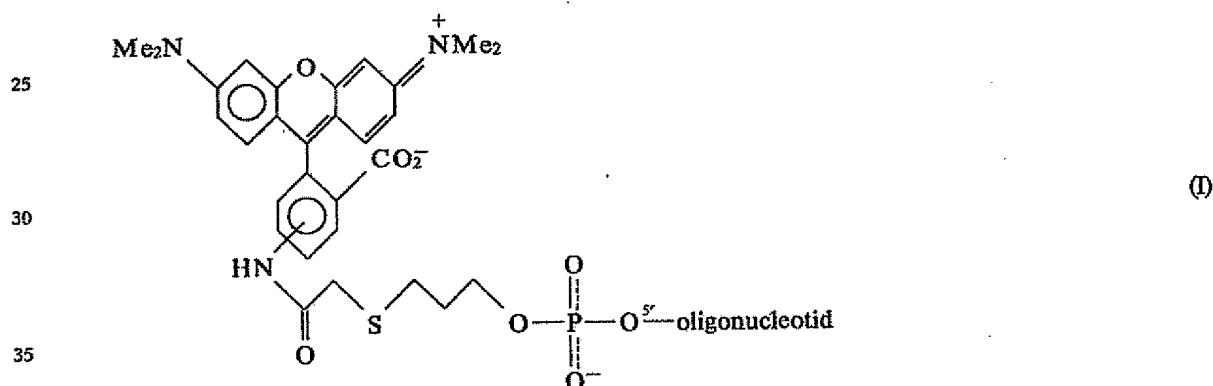
5. Verwendung nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß man die Sequenzanalyse nach der Didesoxy-<sup>15</sup>Methode durchführt.

6. Verwendung nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß man als Primer einen M13-Primer mit Fluoreszenzmarkierung verwendet, der durch Umsetzung seines 5'-(S-Triphenylmethyl-3-mercaptopro-<sup>20</sup>pylphospho)-Derivats mit einem (5- und/oder 6)-Jodacetamino-Rhodamin oder -Fluorescein erhältlich ist.

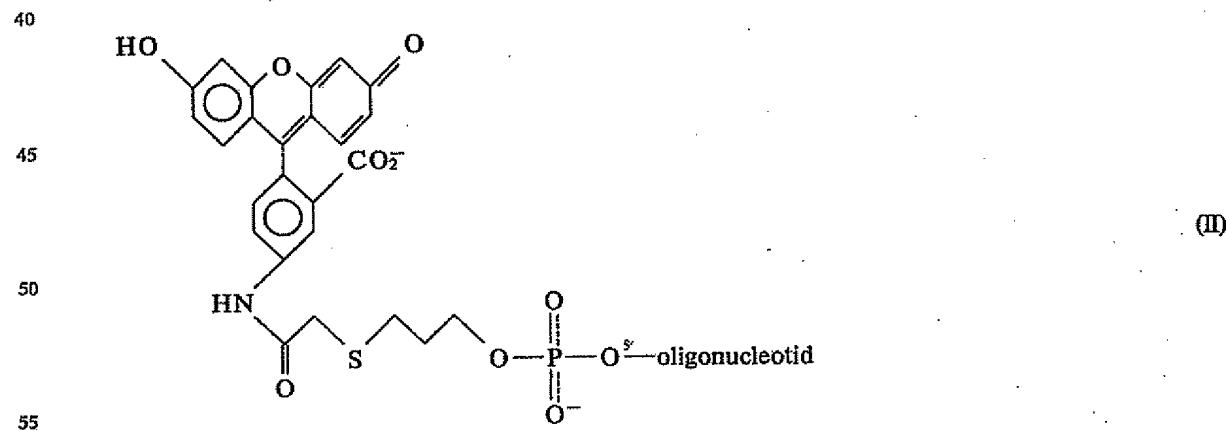
7. Das in den Beispielen beschriebene Verfahren zur Markierung von DNA-Fragmenten.

8. Verwendung von (5- und/oder 6)-Jodacetamino-Rhodaminen oder -Fluoresceinen zur Fluoreszenzmar-<sup>25</sup>kierung organischer Verbindungen, insbesondere von DNA-Fragmenten.

9. Verbindung der Formel I



## 10. Verbindung der Formel II



60

11. Verbindung der Formel I nach Anspruch 10, worin "Oligonukleotid" die Bedeutung d [GTAAAAC-GACGGCCAGT] hat.

12. Verbindung der Formel II nach Anspruch 10, worin "Oligonukleotid" die Bedeutung d [GTAAAAC-GACGGCCAGT] hat.

## Beschreibung

65

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Markierung von DNA-Fragmenten unter Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen und seine Anwendung in der Sequenzanalyse von DNA.

Zur Sequenzanalyse von DNA sind verschiedene Methoden bekannt. Die meisten Verfahren zur Bestimmung der DNA-Sequenz basieren entweder auf einem chemischen Abbau durch basenspezifische chemische Reaktio-

nen (vgl. A. M. Maxam und W. Gilbert, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977) 560—564), oder auf enzymatischen Methoden der Sequenzbestimmung auf der Grundlage der durch DNA-Polymerase katalysierten Verlängerung von DNA-Ketten (vgl. F. Sanger und A. R. Coulson, J. Mol. Biol. 94 (1975) 441—448; F. Sanger et al, Nature 265 (1977) 687—695). Nach der sogenannten "Didesoxy-Methode" werden als spezifische Terminatoren der DNA-Kettenverlängerung 2',3'-Didesoxynukleosid-Triphosphate, z. B. ddA TP, eingesetzt (F. Sanger et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977) 5463—5467; vgl. zusammenfassend auch R. Knippers, Molekulare Genetik, 4. Auflage, Thieme-Verlag Stuttgart, New York 1985, Seiten 402—407). Die enzymatischen Methoden sind insbesondere zur Bestimmung für lange DNA-Sequenzen geeignet, weil für jede einzelne Sequenzierungsreaktion nur ein geringer Arbeitsaufwand erforderlich ist.

Zur Bestimmung der DNA-Fragmente ist es bei allen Sequenzierungsmethoden erforderlich, die DNA-Fragmente spezifisch zu markieren. Dies kann durch Markierung mit radioaktiven Isotopen (radioaktive Markierung) erfolgen. Als radioaktive Isotope werden insbesondere <sup>3</sup>H, <sup>14</sup>C, <sup>35</sup>S und <sup>32</sup>P verwendet. Für einige Bestimmungsmethoden, wie z. B. die "Southern Blot"-Methode, ist eine sehr intensive Markierung erforderlich. Wegen der geringen Strahlungsintensität von <sup>3</sup>H und <sup>14</sup>C kam deshalb nur das Phosphor-Isotop <sup>32</sup>P in Betracht. Die Benutzung dieser Substanz hat jedoch viele Nachteile, die bisher insbesondere den Einsatz der "Southern Blotting"-Methode in der medizinischen Routinediagnostik verhindert haben; <sup>32</sup>P ist sehr teuer, hat eine Halbwertzeit von nur 14,3 Tagen (es muß also schnell verbraucht werden, und eine Lagerhaltung ist unmöglich) und muß nach der Benutzung mit großem Aufwand beseitigt werden. Darüberhinaus sind für Personal und Ausstattung des Labors umfangreiche Sicherheitsvorkehrungen unerlässlich. Auch die Zeit bis zum Vorliegen der Ergebnisse ist in der Regel sehr lang, da mit <sup>32</sup>P markierte gel-elektrophoretisch aufgetrennte DNA-Fragmente meist mehrere Tage bis Wochen auf einem Röntgenfilm liegen müssen, bevor Signale sichtbar werden.

Eine noch größere Rolle spielt dieser zeitliche Aspekt für das Isotop <sup>3</sup>H, das vorwiegend für die "in-situ-Hybridisierung", also den direkten Nachweis von DNA-Sequenzen in histologischen Präparaten, verwendet wird. Hier betragen die Expositionszeiten oft mehrere Monate.

Zur Vermeidung dieser Probleme wurde deshalb vorgeschlagen, die radioaktive Markierung durch eine Markierung mit Nukleotiden zu ersetzen, die über die 5-Stellung des Pyrimidinringes und einen Allylamin-Arm an ein Molekül Biotin gekoppelt sind; solche Nukleotide verhalten sich bei der für die "Southern-Blot"-Methode verwendeten sogenannten "nick-translation" wie ihre unsubstituierten Analoga, wobei die Biotinreste über eine Antikörperreaktion leicht nachgewiesen werden können (vgl. z. B. Nachrichten Chem. Tech. Lab. 34 (1986) Seite 430). Durch Optimierung der experimentellen Bedingungen konnte diese Methode so optimiert werden, daß sie in ihrer Empfindlichkeit mit den radioaktiven Markierungsverfahren vergleichbar ist.

Nach einer anderen Art der DNA-Markierung wird, in Anwendung auf die "Didesoxy-Methode", der M13-Primer in jedem der vier Ansätze mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert, und zwar mit Fluorescein-Isothiocyanat (FITC), 4-Chlor-7-nitrobenzo-2-oxa-1-diazol (NBD-Chlorid), Tetramethylrhodamin-Isothiocyanat (TMRITC) und mit Texasrot (vgl. Bio Technology 3 (1985) 395—396; Nachrichten Chem. Tech. Lab. 34 (1986) 430—431). Die so markierten DNA-Abschnitte können dann mit einem Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und mit einem Laser photometrisch bestimmt werden. Ein Hauptproblem bei dieser Methode ist die optische Empfindlichkeit des photometrischen Systems, weil jedes DNA-Fragment nur ein Molekül des Fluoreszenzmarkers enthält, woraus sich eine Konzentration des Fluoreszenzfarbstoffs im Gel von nur ca.  $10^{-10}$  M ergibt. Nach dieser Methode wurden bisher nur synthetische Oligonukleotide analysiert.

L. M. Smith et al (Nucleic Acids Research 13 (1985) 2399—2412) beschreiben die Synthese von Oligonukleotiden mit einer aliphatischen Aminogruppe an ihrer 5'-Endstelle. Diese Aminogruppe kann mit einer Vielzahl elektrophiler Reagenzien umgesetzt werden. Auf diese Weise lassen sich Fluoreszenzfarbstoffe an chemisch synthetisierte DNA-Primer-Oligonukleotide kovalent binden.

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Markierung von DNA-Fragmenten (Oligonukleotiden) unter Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man die DNA-Fragmente (Oligonukleotide) in ihr 5'-(S-Triphenylmethyl-3-mercaptopropylphospho)-Derivat überführt und dieses nach Abspaltung der Triphenylmethylgruppe (Tritylgruppe) mit einem (5- und/oder 6)-Jodacetamino-Rhodamin oder -Fluorescein (englisch: (5- and/or 6)-Jodacetamido-rhodamine or -fluoresceine) umsetzt.

Als Rhodamingerüst in den Jodacetamino-derivaten können alle Rhodamine, wie z. B. Rhodamin, Tetraethylrhodamin (Rhodamin B), Rhodamin 6G eingesetzt werden, als Fluoresceingerüst alle Fluoresceine, wie z. B. Fluorescein oder Tetrabromfluorescein (Eosin).

Aufgrund seiner Fluoreszenzeigenschaften wird erfindungsgemäß das (5- und/oder 6)-Jodacetamino-tetraethylrhodamin bevorzugt eingesetzt. Es besitzt einen sehr hohen Extinktionskoeffizienten, eine hohe Quantenausbeute, und eine Emission im langen Wellenbereich ( $\lambda_{max} = 560$  nm) mit einer Bandbreite bei halbem Maximum von 52 nm. Ein bevorzugt eingesetztes (5- und/oder 6)-Jodacetamino-Fluoresceinderivat ist das 5-Jodacetamino-Fluorescein.

Die Formeln I und II zeigen die Struktur von nach dem erfindungsgemäßen Verfahren mit Tetramethylrhodamin (I) und mit Fluorescein (II) markierten DNA-Fragmenten.

5

10

15

20

25

30

35

40

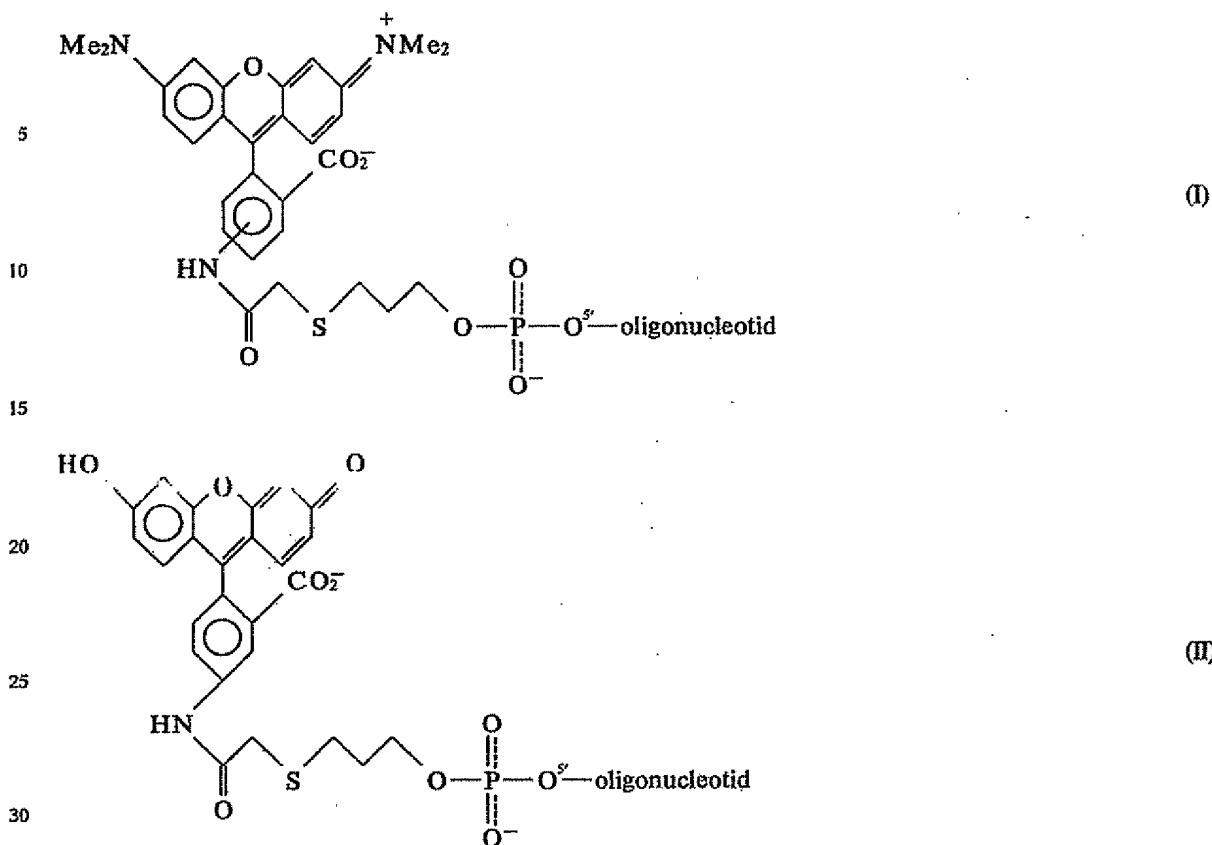
45

50

55

60

65



35 Aufgrund ihrer Eigenschaften eignen sich die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren markierten DNA-Fragmente sehr gut zur Sequenzanalyse von DNA. Gegenstand der Erfindung ist deshalb auch die Verwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Markierung von DNA-Fragmenten zur Sequenzanalyse von DNA.

40 Bevorzugt wird das erfindungsgemäße Verfahren zur Sequenzanalyse nach der Didesoxy-Methode eingesetzt, wobei man als Primer insbesondere einen M13-Primer mit Fluoreszenzmarkierung verwendet, der durch Umsetzung seines 5'-(S-Triphenyl-methyl-3-mercaptopropylphospho)-Derivats nach Abspaltung der Triphenylmethylgruppe mit einem (5- und/oder 6)-Jodacetamino-Rhodamin oder -Fluorescein erhältlich ist. Es ist aber auch eine Markierung anderer Oligonukleotide möglich, indem man sie in ihr entsprechendes 5'-(S-Triphenylmethyl-3-mercaptopropylphospho)-Derivat überführt und dieses nach Abspaltung der Triphenylmethylgruppe (Tritylgruppe) mit einem (5- und/oder 6)-Jodacetamino-Rhodamin oder -Fluorescein umsetzt.

45 Das erfindungsgemäße Verfahren stellt eine zuverlässige, einfache und kostengünstige Methode zur Markierung von DNA-Fragmenten dar, mit dem die Nachteile des Standes der Technik weitgehend vermieden werden können. Aufgrund der Empfindlichkeit der markierten DNA-Fragmente eignet sich das Verfahren auch sehr gut zur laser-induzierten photometrischen Bestimmung der markierten DNA-Fragmente in automatischen Geräten, z. B. in dem in der deutschen Patentanmeldung der gleichen Anmelderin vom gleichen Anmeldetag (Titel: Vorrichtung zur Detektion von zur Photonemission anregbaren Stoffen) beschriebenen Gerät, sowie auch für andere Bioresearch- und Biotechnologieverfahren unter Verwendung markierter DNA-Fragmente.

50 Weiterer Gegenstand der Erfindung ist auch die Verwendung von (5- und/oder 6)-Jodacetamino-Rhodaminen oder -Fluoresceinen zur Fluoreszenzmarkierung organischer Verbindungen, insbesondere von DNA-Fragmenten.

55 Die Herstellung der 5'-(S-Triphenylmethyl-3-mercaptopropyl-phospho)-Oligonukleotide kann durch Kondensation von Triethylammonium [S-triphenylmethyl-3-mercaptopropyl, 2-(1-methylimidazol-2-yl)phenylphosphat] mit der 5'-terminalen Hydroxy-Gruppe eines an einen Träger (z. B. langketiges Alkylamin/Glas) gebundenen Oligonukleotids erfolgen (vgl. B. S. Sproat et al, Nucleic Acids Research 14 (1986) 1811–1824).

60 Die Abspaltung der Triphenylmethylgruppe (Detrylierung) kann z. B. mit Silbernitrat analog der von B. A. Connolly und P. Rider (Nucleic Acids Res. 13 (1985) 4485–4502) beschriebenen Methode erfolgen. Die so erhaltene Verbindung mit freier SH-Gruppe wird dann bei einem pH-Wert von ca. 8,5 mit dem (5- und/oder 6)-Jod-acetamido-Rhodamin oder -Fluorescein umgesetzt.

65 Die nachfolgenden Beispiele sollen die Erfindung näher erläutern, ohne sie darauf zu beschränken. Wenn nicht anders angegeben, beziehen sich Prozent- und Gewichtsangaben auf Gewichtsprozente und Gewichtsteile, die Temperatur auf die Celsius-Skala..

#### Beispiele

Die Lösungsmittel und Reagentien für die Festphasen-Oligodeoxyribonukleotid-Synthese nach der Phosphotriester-Methode wurden wie bei B. S. Sproat et al, I. c. beschrieben hergestellt. Das S-Triphenylmethyl-3-mer-

captopropanol wurde nach B. A. Connolly und P. Rider, l. c. hergestellt. Das (5- und/oder 6)-Jodacetamino-tetramethylrhodamin wurde von Molecular Probes, Inc., Junction City, Oregon, USA, bezogen.

Die NMR-Spektren wurden an einem Bruker AM250-Spektrometer aufgenommen.

5

Beispiel 1

Darstellung von Triethylammonium-[S-triphenylmethyl-3-mercaptopropyl, 2-(1-methylimidazol-2-yl)phenylphosphat]

S-Triphenylmethyl-3-mercaptopropanol (3,34 g, 10 mMol) wurde durch die bei B. S. Sproat et al, l. c. beschriebene Methode in die Titelverbindung übergeführt. Das Rohprodukt wurde auf eine Kieselgel 60 H-Säule (170 g, 8 cm x 7 cm; Dichlormethan/Triethylamin = 99/1, v/v) aufgebracht und die Säule dann mit Dichlormethan/Triethylamin (0,5 l, 99/1, v/v), Ethanol/Dichlormethan/Triethylamin (0,5 l, 4/95/1, v/v), und schließlich mit Ethanol/Dichlormethan/Triethylamin (1,5 l, 10/89/1, v/v) unter Verwendung eines Stickstoffdruckes eluiert. Die das reine Produkt enthaltenden Fraktionen (bestimmt durch Silicagel-Dünnschichtchromatographie;  $R_f = 0,11$ , unter Verwendung von Ethanol/Chloroform/Triethylamin = 10/89/1, v/v als Eluans; das Besprühen der Platte mit 70%iger Perchlorsäure/Ethanol = 3/2, v/v ergab einen gelborangen Fleck) wurden gesammelt und im Vakuum eingedampft, wobei ein etwas hygroskopischer weißer Schaum (1,6 g, 24% Ausbeute) zurückblieb. Das erhaltene Produkt zeigte die entsprechenden  $^{31}\text{P}$ - und  $^{13}\text{C}$  NMR-Spektren.

10

15

20

Beispiel 2

5'-(S-Triphenylmethyl-3-mercaptopropylphospho)-d[GTAAACGACGCCAGT]

Vollständig geschütztes [GTAAACGACGCCAGT] wurde mittels einer hoch wirksamen Phosphotriester-Methode (vgl. B. S. Sproat et al, l. c.) im 1  $\mu\text{Mol}$ -Maßstab an einen Träger (langketiges Alkylamin/Porenglas) gebunden. Danach wurde ein weiterer Reaktionszyklus durchgeführt, bei dem Triethylammonium [S-triphenylmethyl-3-mercaptopropyl, 2-(1-methylimidazol-2-yl)phenylphosphat] mit der 5'-terminierten Hydroxy-Gruppe des an den Träger gebundenen Oligodesoxyribonukleotids kondensiert wurde. Das modifizierte Oligodesoxyribonukleotid wurde von den Schutzgruppen befreit und vom Träger wie bei B. S. Sproat et al, l. c. beschrieben unter Verwendung von Oximat, gefolgt von 25%igem Ammoniak, abgetrennt. Nach der Ammoniakstufe wurde das Rohprodukt durch Dialyse entsalzt, und das gewünschte 5'-(S-Triphenylmethyl-3-mercaptopropylphospho)-oligodesoxyribonukleotid durch reserved phase-Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) an  $\mu$ -Bondapak-C<sub>18</sub> unter Verwendung von 0,1 M Triethylammoniumacetat (pH = 7)/Acetonitril als Eluens gereinigt. Die S-Triphenylmethyl-Verbindung kam bei einer Pufferzusammensetzung von ca. 29% Acetonitril. Die das Produkt enthaltende Lösung wurde im Vakuum zur Trockne verdampft und hinterließ ein weißes Glas (ca. 160 nMol, bestimmt durch UV-Spektroskopie).

25

30

35

Beispiel 3

Herstellung der mit Tetramethylrhodamin markierten d[GTAAACGACGCCAGT] (Formel I)

40

5'-(S-Triphenylmethyl-3-mercaptopropylphospho)-d[GTAAACGACGCCAGT] (ca. 20 nMol) wurde mit Silbernitrat gemäß der von B. A. Connolly und P. Rider, l. c., beschriebenen Methode mit Silbernitrat detriptyliert, und nach Entfernung der Silberionen mit Dithiothreitol wurde eine kleine Menge der Lösung durch reserved-phase-Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) an  $\mu$ -Bondapak C<sub>18</sub> analysiert. Das 5'-(3-Mercaptopropylphospho)oligodeoxyribonukleotid eluierte bei einer Acetonitrilzusammensetzung von ca. 14%. Der pH-Wert der das Mercaptooligodeoxyribonukleotid enthaltenden Lösung wurde mit Natriumbicarbonatlösung auf 8,5 eingestellt, und eine Lösung von (5- und/oder 6)-Jodacetamino-tetramethylrhodamin (200 nMol) in N,N-Dimethylformamid (50  $\mu\text{l}$ ) wurde zugefügt. Die Lösung wurde sorgfältig gemischt und im Dunkeln bei Raumtemperatur eine Stunde lang belassen. Die rosafarbene Lösung wurde dann gegen Wasser dialysiert und das mit Tetramethylrhodamin markierte Oligodeoxyribonukleotid wurde durch Ionenaustausch-Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) an Partisil 10SAX gereinigt unter Verwendung eines Konzentrationsgradienten von Kaliumdihydrogenphosphat, pH = 6,3, in Formamid/Wasser (6/4, v/v) als Eluans. Das gereinigte, mit Tetramethylrhodamin markierte Oligonukleotid wurde dann durch Dialyse entsalzt und im Dunkeln bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

45

50

55

Der so hergestellte, fluoreszenzmarkierte M13-Primer der Formel I wurde zur Durchführung von verbesserten Standard-Dideoxy-Methoden, wie sie bei S. A. Williams et al, Biotechniques 4 (1986) 138–147 beschrieben sind, eingesetzt, wobei das Dideoxy/Deoxy-Verhältnis so optimiert wurde, um eine gute Markierung der ersten 300 bis 400 Basen sicherzustellen. Es wurden sehr gute Ergebnisse erhalten.

60

Beispiel 4

Herstellung der mit Fluorescein markierten d[GTAAACGACGCCAGT] (Formel II)

65

Wie in Beispiel 3 beschrieben, wurde das 5'-(3-mercaptopropylphospho)-oligodeoxyribonukleotid mit 5-Jodacetamino-fluorescein anstelle von Jodeacetamino-tetramethylrhodamin umgesetzt. Das mit Fluorescein markierte Oligodeoxyribonukleotid wurde dann zunächst durch Ionenaustausch-Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie (HPLC) gereinigt. Nach Entsalzung durch Dialyse wurde das fluoreszenzmarkierte Oligodeoxyribonu-

# OS 36 42 939

leotid dann weiter durch Umkehrphasen-HPLC an einer Aquapore RP-300 C<sub>8</sub>-Säule gereinigt. Das Produkt (fluoreszenzmarkierter M13-Primer) eluiert bei einem Acetonitrilgehalt von ca. 25% und wird danach durch Dialyse entsalzt.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

**Abstract of DE3642939**

A process for labelling DNA fragments (oligonucleotides) using fluorescent dyes. The labelling is carried out by converting the DNA fragment into its 5'-[HS-(Y)z]-derivative, and the latter is reacted with a derivative of a fluorescent dye, which together with the 5'-[HS-(Y)z]-derivative forms a DNA fragment of the formula (I) fluorophore-X-S-(Y)z-CH <SIGN> -oligonucleotide, wherein X and Y independently are a group comprising one or more carbon atoms and/or hetero atoms, z = 0 or 1, and fluorophore is the residue of a fluorescent dye. In a preferred embodiment the DNA fragment is converted into its 5'-(S-triphenylmethyl-3-mercaptopropyl phospho)-derivative and the 5'-(3-mercaptopropyl phospho)-derivative obtained after cleavage of the triphenylmethyl group is reacted with a (5- and/or 6)-iodoacetamino-rhodamine or -fluorescein.